

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 4月 8日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-103898
[ST. 10/C]: [JP2003-103898]

出 願 人
Applicant(s): 三菱瓦斯化学株式会社

REC'D 03 JUN 2004

WIPO

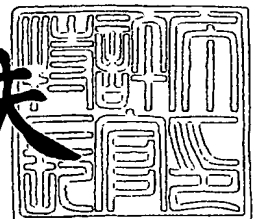
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P2003-134

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/12

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県新潟市太夫浜字新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内

【氏名】 樋口 靖

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県新潟市太夫浜字新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内

【氏名】 田中 昭宣

【発明者】

【住所又は居所】 新潟県新潟市太夫浜字新割 1 8 2 番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内

【氏名】 長谷見 隆司

【特許出願人】

【識別番号】 000004466

【氏名又は名称】 三菱瓦斯化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100117891

【弁理士】

【氏名又は名称】 永井 隆

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 025737

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1



【包括委任状番号】 0102335

【プルーフの要否】 要

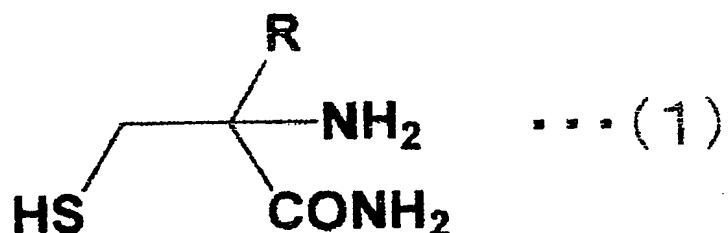
【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法

【特許請求の範囲】

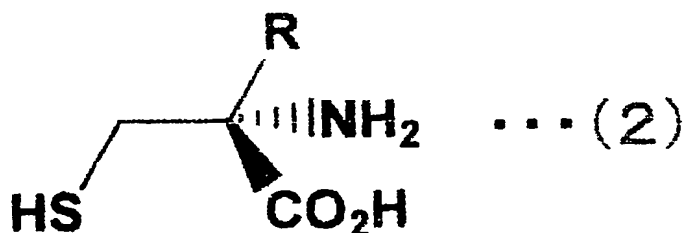
【請求項 1】 一般式 1 で示される 2-アルキルシステインアミドに、2-アルキル-L-システインアミドを立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて、一般式 2 で示される 2-アルキル-L-システインを生成せしめることを特徴とする、光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法。

【化 1】



(一般式 1 中の R は炭素数 1 ~ 4 の低級アルキル基を示す)

【化 2】



(一般式 2 中の R は炭素数 1 ~ 4 の低級アルキル基を示す)

【請求項 2】 2-アルキル-L-システインアミドを立体選択的に加水分解する活性を有する微生物が、プロタミノバクター属、ミコバクテリウム属、ミコプラナ属、キサントバクター属に属する細菌である、請求項 1 記載の光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法。

【請求項 3】微生物菌体又は菌体処理物を作用させて行なう立体選択的加水分解反応を、不活性ガス気流下及び／又は還元物質の共存下で行なう、請求項 1、2 に記載の光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法。

【請求項 4】一般式 1 及び 2 において R がメチル基である、請求項 1 から 3 に記載の光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、一般式 1 で示される 2-アルキルシステインアミドより、一般式 2 で示される光学活性 2-アルキル-L-システインを製造する方法に関する。さらに詳しくは、一般式 1 で示される 2-アルキルシステインアミドに 2-アルキル-L-システインアミドを立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて生化学的に不斉加水分解して、一般式 2 で示される光学活性 2-アルキル-L-システインを製造する方法に関する。光学活性 2-アルキル-L-システインは、医薬、農薬、各種工業薬品の製造中間体として重要な物質である。

【0002】

【従来の技術】

従来、光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法として、例えば、光学活性な L-システインメチルエステルを出発原料として、ピバルアルデヒドで環化、ホルムアルデヒドで保護し、リチウム試薬とヨウ化メチルでメチル化した後、塩酸で開環、脱保護して 2-メチル-L-システインを塩酸塩として得る方法がある（例えば、特許文献 1 参照）。しかしながら、この方法は光学活性体を出発原料とする必要があり、工程数が多く煩雑であり、しかも高価な試薬を必要とするため、工業的に優れた方法とはいえない。

一般式 1 で示される 2-アルキルシステインアミドを微生物が有する酵素を利用して不斉加水分解し、一般式 2 で示される光学活性 2-アルキル-L-システインを製造する方法は、報告されていない。

【0003】

【特許文献1】

米国特許6,403,830号明細書

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、従来技術における上記のような課題を解決し、光学活性な医薬品、農薬、各種工業薬品の製造中間体として有用な、光学活性2-アルキル-L-システインを少ない工程数で安価に製造する方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

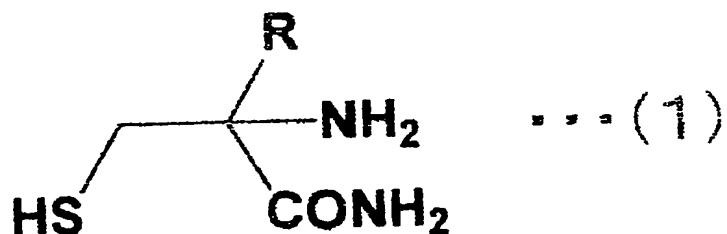
本発明者らは、少ない工程数で安価に光学活性2-アルキル-L-システインを製造する方法に関して鋭意検討を行った結果、2-アルキルシステインアミドを生化学的に不斉加水分解して光学活性2-アルキル-L-システインを製造する本発明に到達した。

【0006】

即ち、本発明は、一般式1で示される2-アルキルシステインアミドに、2-アルキル-L-システインアミドを立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて、一般式2で示される2-アルキル-L-システインを生成せしめることを特徴とする、(1)から(4)に示す光学活性2-アルキル-L-システインの製造方法に関する。

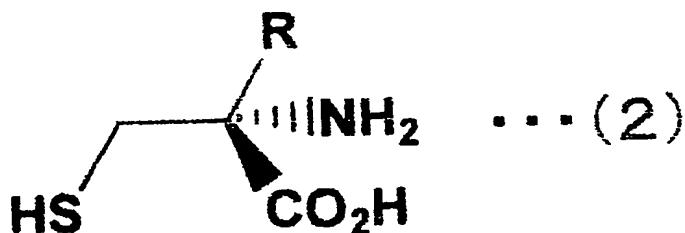
(1) 一般式1で示される2-アルキルシステインアミドに、2-アルキル-L-システインアミドを立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて、一般式2で示される2-アルキル-L-システインを生成せしめることを特徴とする、光学活性2-アルキル-L-システインの製造方法。

【化 3】



(一般式 1 中の R は炭素数 1 ～ 4 の低級アルキル基を示す)

【化 4】



(一般式 2 中の R は炭素数 1 ～ 4 の低級アルキル基を示す)

(2) 2-アルキル-L-システインアミドを立体選択的に加水分解する活性を有する微生物が、プロタミノバクター属、ミコバクテリウム属、ミコプラナ属、キサントバクター属に属する細菌である、(1) 記載の光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法。

(3) 微生物菌体又は菌体処理物を作用させて行なう立体選択的加水分解反応を、不活性ガス気流下及び／又は還元物質の共存下で行なう、(1)、(2) に記載の光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法。

(4) 一般式 1 及び 2 において R がメチル基である、(1) から (3) に記載の光学活性 2-アルキル-L-システインの製造方法。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下に本発明の詳細について説明する。

本発明の原料となる一般式 1 に示す 2-アルキルシステインアミドの R は、炭

素数 1～4 の低級アルキル基であればよく、特に制限はないが、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、secブチル及びtertブチルなどの直鎖または分枝した低級アルキル基が好適であり、メチル基が特に好適である。

また 2-アルキルシステインアミドは、遊離物の他、塩酸塩、硫酸塩、酢酸塩等の無機及び有機塩を用いることが可能であり、その製法及び品質等に特に制限はなく、例えば Justus Liebigs Ann. Chem. (1966), 697, 140-157 に記載された方法により合成される 4-アルキルチアゾリジン-4-カルボン酸アミド誘導体を部分的に加水分解して開環する方法等によって得ることができる。

【0008】

本発明の一般式 1 で示される 2-アルキルシステインアミドの生化学的不斉加水分解に使用される微生物は、目的の 2-アルキル-L-システインに対応する 2-アルキル-L-システインアミドを立体選択的に加水分解する活性を有する微生物であればよく、このような微生物として、例えば、プロタミノバクター属、ミコバクテリウム属、ミコプラナ属、及びキサントバクター属等に属する微生物、具体的にはプロタミノバクター アルボフラバス (*Protaminobacter albolavus*) ATCC8458、ミコバクテリウム メタノリカ (*Mycobacterium methanolicum*) BT-84 (FERM P8823)、ミコバクテリウム メタノリカ (*Mycobacterium methanolicum*) P-23 (FERM P8825)、ミコプラナ ラモサ (*Mycoplasma ramosum*) NCIB9440、ミコプラナ デイモルファ (*Mycoplasma dimorphum*) ATCC4279、キサントバクター オートトロピカス (*Xanthobacter autotrophicus*) DSM597、キサントバクター フラバス (*Xanthobacter flavus*) NCIB 10071T が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、これら微生物から人工的変異手段によって誘導される変異株、あるいは細胞融合もしくは遺伝子組換え法等の遺伝学的手法により誘導される組換え株等のいずれの株であっても上記能力を有するものであれば、本発明に使用できる。

【0009】

これらの微生物の培養は、通常資化し得る炭素源、窒素源、各微生物に必須の無機塩、栄養等を含む培地を用いて行われる。培養時の pH は 4～10 の

範囲が好ましく、温度は20～50℃が好ましい。培養は1日～1週間程度好気的に行われる。このようにして培養した微生物は、生菌体又は該生菌体処理物、例えば培養液、分離菌体、菌体破碎物、さらには精製した酵素として反応に使用される。また、常法に従って菌体または酵素を固定化して使用することもできる。

【0010】

2-アルキルシステインアミドの生化学的不斉加水分解反応の条件は、2-アルキルシステインアミド濃度0.1～40wt%、2-アルキルシステインアミドに対する微生物の使用量は、乾燥菌体として重量比0.0001～3、反応温度10～70℃、pH4～13の範囲が好ましい。

【0011】

反応原料である2-アルキルシステインアミド、及び生成物である2-アルキルシステインは酸化を受けやすく、酸素存在下で放置すると2量化したジスルフィド(2, 2'-ジアルキルシスチン)となる。これを防止するため、生化学的不斉加水分解反応は遊離の酸素や酸素供与体を排除した雰囲気下で行なうことが望ましく、例えば、窒素、アルゴン等の不活性ガス気流下、あるいは反応系内に2-メルカプトエタノール等の酸素受容体となる還元性物質を共存させた条件下で行うことが好ましい。

【0012】

2-アルキルシステインアミドの生化学的不斉加水分解反応で生成した光学活性2-アルキル-L-システインは、反応終了液から、例えば遠心分離あるいは濾過膜などの通常の固液分離手段により微生物菌体を除いた母液をpH4～7に調整して濃縮した後、冷却して晶析する結晶を濾別することによって得ることができる。また必要に応じて、母液に活性炭等の吸着剤を加え処理した後に濃縮したり、母液の濃縮物に水溶性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール類、アセトン等のケトン類、テトラヒドロフランやジオキサン等のエーテル類、またはこれらを組み合わせた混合溶媒、さらには水を含むこれらの混合溶媒等を加えて再溶解した後、冷却し晶析することによっても好適に2-アルキルシステインを得ることができる。

【0013】

以上のようにして、例えば2-メチル-L-システイン、2-エチル-L-システイン等の光学活性2-アルキル-L-システインを製造することができる。

【0014】

【実施例】

本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

参考例 1

a. 2, 2, 4-トリメチルチアゾリンの製造

水酸化ナトリウム (70%) 250 g を 500 mL の水に溶かし、これを攪拌しながら氷浴にて 5℃ に冷却し、ここにクロロアセトン 278 g をゆっくりと滴下した。滴下終了後、氷浴にて室温に戻し、アセトン 261 g を添加し、続いて塩化メチレン 800 mL を添加した。内温が 30℃ を越えないように氷浴で調節しながら、25% アンモニア水 616 g をゆっくりと滴下した。滴下終了後 4 時間攪拌した後、反応液を分液して有機層を飽和食塩水で 1 回、純水で 2 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを加えて 3 時間攪拌し乾燥した。固形物を濾別した後、濾液を減圧蒸留して 2, 2, 4-トリメチルチアゾリン 290 g (74.8 mol%) を得た。

b. 2, 2, 4-トリメチル-4-シアノチアゾリンの製造

上記のようにして得られた 2, 2, 4-トリメチルチアゾリン 317 g をジエチルエーテル 500 mL に溶解し、これを 15℃ に調節した。この溶液を攪拌しつつ、20℃ を越えないように調節しながら青酸ガス 132.7 g をゆっくりとバブリングした。青酸ガス吹込み後 3 時間、20℃ に調節しながら攪拌を継続した。反応液をアスピレータで減圧にしてジエチルエーテルを留去し、白色固体を得た。得られた白色個体を、ジエチルエーテル/ヘキサン = 800/350 mL の混合溶媒に溶解し、この溶液を -50℃ に冷却して析出した結晶を濾取し、更に濾液を濃縮して析出した結晶を濾取し、併せて 384 g (83 mol%) の 2, 2, 4-トリメチル-4-シアノチアゾリンを得た。

c. 2, 2, 4-トリメチルチアゾリン-4-カルボン酸アミドの製造

濃塩酸 (36%) 1924 g を 20℃以下に調節しながら攪拌し、ここに 2, 2, 4-トリメチル-4-シアノチアゾリジン 258 g をゆっくりと加え、25℃に上げて13時間攪拌した。析出した結晶を濾別し、ジエチルエーテルで洗浄、減圧乾燥して 2, 2, 4-トリメチルチアゾリジン-4-カルボン酸アミド塩酸塩 97 g (46 mol%) を得た。さらに結晶濾別後の濾液を氷浴で冷却し、これを攪拌しながら、25%アンモニア水 1228 g をゆっくりと滴下し、析出した結晶を濾別後、純水 800 mL で洗浄し、2, 2, 4-トリメチルチアゾリジン-4-カルボン酸アミド 67 g (38 mol%) を得た。

d. 2-メチルシステインアミド塩酸塩の製造

この 2, 2, 4-トリメチルチアゾリジン-4-カルボン酸アミド塩酸塩 90 g を純水 1L に溶解し、3時間、加熱還流した後、反応液を濃縮後に減圧乾燥して、2-メチルシステインアミド塩酸塩 77 g (96 mol%) を得た。

【0015】

実施例 1

次の組成を有する培地を調製し、この培地 200 mL を 1L の三角フラスコに入れ、滅菌後、キサントバクター フラバス (*Xanthobacter flavus*) NCIB 1007 1T を接種し、30℃で48時間振とう培養を行った。

培地組成 (pH7.0)

| | |
|---------------------------------------|--------|
| グルコース | 10 g |
| ポリペプトン | 5 g |
| 酵母エキス | 5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1 g |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.4 g |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.01 g |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.01 g |
| 水 | 1L |

次いで培養液から、遠心分離により、乾燥菌体 1.0 g に相当する生菌体を得た。参考例 1 により製造した 2-メチルシステインアミド塩酸塩 10.0 g (0.06 mol) を 50 mM リン酸バッファー 300 mL に溶かした後、500 mL フラ

スコに入れ、乾燥菌体 1.0 g に相当する生菌体を加えて、窒素気流下、30℃で 24 時間攪拌して加水分解反応を行った。

反応後、反応液から遠心分離によって菌体を除去して上清を得た。この上清液に脱気後に不活性ガス置換した活性炭 2 g を加えて 2 時間攪拌した後、活性炭を濾別してからエバポレーターで減圧にて水を留去し、白色ペースト状固体を得た。このペースト状濃縮物にイソプロパノール 20 mL を加えて加熱攪拌後、5℃にて一夜静置して析出した結晶を濾取した。濾取した結晶をエタノールより再結晶して 2-メチル-L-システイン 2.6 g (0.02 mol) を得た。反応に仕込んだラセミ混合物中の 2-メチル-L-システインアミドからの単離収率は 76 mol%、2-メチル-L-システインアミドのラセミ混合物からの単離収率は 38 mol% であった。また、この固体を光学異性体分離カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって分析した結果、光学純度は 98 %e.e. 以上であった。

【0016】

実施例 2

実施例 1 と同様にして各種微生物を培養し、生菌体を得た。2-メチルシステインアミド 10 g (0.06 mol) を基質とし、各種微生物の生菌体を用いて、実施例 1 と同様に酵素反応を行い、除菌した上清液を液体クロマトグラフィーで分析した。結果を表 1 に示す。なお、該上清液を光学異性体分離カラムを用いた液体クロマトグラフィーによって分析した結果、光学純度はいずれも 90 %e.e. 以上であった。

なお、表 1 に示した略号の詳細は以下の通りである。

収率①；ラセミ混合物の 2-メチルシステインアミドを基準とした 2-メチル-L-システインの収率 (mol%)

収率②；ラセミ混合物中の 2-メチル-L-システインアミドを基準とした 2-メチル-L-システインの収率 (mol%)

菌体 1；プロタミノバクター アルボフラバス (Protaminobacter alboblavus) ATCC8458

菌体 2；ミコバクテリウム メタノリカ (Mycobacterium methanolica) BT-84 (FERM P8823)

菌体 3 ; ミコバクテリウム メタノリカ (*Mycobacterium methanolica*) P-23
(FERM P8825)

菌体 4 ; ミコプラナ ラモサ (*Mycoplana ramosa*) NCIB9440、

菌体 5 ; ミコプラナ デイモルファ (*Mycoplana dimorpha*) ATCC4279

菌体 6 ; キサントバクター オートトロピカス (*Xanthobacter autotrophicus*)

DSM597

【表 1】

表 1

| 菌体 | 収率① | 収率② | 光学純度 (e.e.%) |
|------|-----|-----|-----------------|
| 菌体 1 | 29 | 58 | 91.2 |
| 菌体 2 | 35 | 70 | 92.1 |
| 菌体 3 | 33 | 66 | 90.5 |
| 菌体 4 | 32 | 65 | 90.0 |
| 菌体 5 | 25 | 50 | 93.8 |
| 菌体 6 | 37 | 74 | 98.2 |

【発明の効果】 ラセミ混合物である 2-メチルシステインアミドに 2-アルキルーL-システインアミドを立体選択的な加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させて 2-メチルーL-システインを製造する本発明の方法により、医薬品、農薬、各種工業薬品の製造中間体として非常に重要な光学活性 2-アルキルーL-システインを少ない工程数で安価に製造することが可能となり工業に大きく貢献する。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 出発原料として光学活性体を必要とせず、簡略な工程で効率良く光学活性 2-アルキル-L-システインを製造できる、経済的にすぐれた方法を提供する。

【解決手段】 ラセミ混合物である 2-アルキルシステインアミドに、2-アルキル-L-システインアミドを立体選択的に加水分解する活性を有する微生物の菌体又は菌体処理物を作用させることによって、光学活性な 2-アルキル-L-システインを製造する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

| | |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 3 - 1 0 3 8 9 8 |
| 受付番号 | 5 0 3 0 0 5 8 0 7 9 2 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 0 0 9 4 |
| 作成日 | 平成 1 5 年 4 月 9 日 |

< 認定情報・付加情報 >

| | |
|-------|------------------|
| 【提出日】 | 平成 1 5 年 4 月 8 日 |
|-------|------------------|

次頁無

特願 2003-103898

出願人履歴情報

識別番号

[000004466]

1. 変更年月日

1994年 7月26日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

氏 名

三菱瓦斯化学株式会社